

DEVICE AND METHOD FOR DETECTING PHOTOSYNTHESIS INHIBITION

Publication number: JP2004533853 (T)

Publication date: 2004-11-11

Inventor(s):

Applicant(s):

Classification:

- international: **C12M1/34; C12Q1/00; C12Q1/02; G01N21/64; G01N21/78; G01N33/50; C12M1/34; C12Q1/00; C12Q1/02; G01N21/64; G01N21/77; G01N33/50; (IPC1-7): C12M1/34; C12Q1/00; C12Q1/02; G01N21/64; G01N21/78**

- European: **C12Q1/02B; G01N33/50F**

Application number: JP20030512441T 20020626

Priority number(s): DE20011033273 20010709; WO2002EP07057 20020626

Also published as:



WO03006684 (A2)

WO03006684 (A3)

US2008169431 (A1)

US2004178358 (A1)

US7333195 (B2)

more >>

Abstract not available for JP 2004533853 (T)

Abstract of corresponding document: **WO 03006684 (A2)**

A method, system and test strip for detecting photosynthesis inhibition in substances by providing cells or parts of cells with an intact photosystem, inserting said cells or cell parts into a planar layer, placing the test substance on the planar layer or inside the planar layer, exciting the luminescence of the cells or cell parts in the planar layer by an exciting light source, measuring the luminescence of the cells or cell parts in the planar layer by means of a detector and associating the detector signal with the degree of photosynthesis inhibition.

Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-533853

(P2004-533853A)

(43) 公表日 平成16年11月11日(2004.11.11)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/00	C 1 2 Q 1/00	Z 2 G 0 4 3
C 1 2 M 1/34	C 1 2 M 1/34	A 2 G 0 5 4
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 M 1/34	B 4 B 0 2 9
G 0 1 N 21/64	C 1 2 Q 1/02	4 B 0 6 3
G 0 1 N 21/78	G 0 1 N 21/64	B
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 42 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-512441 (P2003-512441)	(71) 出願人	302063961
(86) (22) 出願日	平成14年6月26日 (2002. 6. 26)		バイエル・クロツプサイエンス・アクチエ ンゲゼルシャフト
(85) 翻訳文提出日	平成16年1月8日 (2004.1.8)		ドイツ40789モンハイム・アルフレー ト・ノベル・シュトラッセ50
(86) 国際出願番号	PCT/EP2002/007057	(74) 代理人	100062007
(87) 国際公開番号	W02003/006684		弁理士 川口 義雄
(87) 国際公開日	平成15年1月23日 (2003.1.23)	(74) 代理人	100113332
(31) 優先権主張番号	101 33 273.4		弁理士 一入 章夫
(32) 優先日	平成13年7月9日 (2001.7.9)	(74) 代理人	100114188
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		弁理士 小野 誠
		(74) 代理人	100103920
			弁理士 大崎 勝真
		(74) 代理人	100124855
			弁理士 坪倉 道明
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 光合成阻害を検出する装置および方法

(57) 【要約】

無傷光化学系を有する細胞または細胞部分を提供し、平面層に前記細胞または細胞部分を挿入し、試験物質を平面層上に、または平面層内に置き、励起光源によって平面層内の細胞または細胞部分の発光を励起させ、検出器を用いて平面層内の細胞または細胞部分の発光を測定し、検出器信号を光合成阻害の程度と関連付けることによる、物質の光合成阻害を検出する方法、システムおよびテストストリップ。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

無傷の光化学系を有する細胞または細胞部分を提供するステップと、
平面層に細胞または細胞部分を導入するステップと、
試験物質を平面層に、または平面層内に加えるステップと、
励起光源によって平面層内の細胞または細胞部分の発光を励起させるステップと、
検出器を用いて平面層内の細胞または細胞部分の発光を測定するステップと、
検出器信号を光合成阻害の程度と関連付けるステップと
を含む、物質の光合成阻害活性の検出方法。

【請求項 2】

前記細胞が、藻類、微細藻類、シアノバクテリア、光合成系を有する他の細菌、植物細胞培養物または植物ホモジネート、選択した変異体または遺伝的に改変した生物のうちから選択されることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記細胞が、光合成系 I I が無傷のままの元気な細胞であることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記平面層の基質が、好ましくはアガロースまたはアクリル酸または他のゲル化剤または他の粘性培地からなることを特徴とする請求項 1 から 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

前記平面層の厚さが、0.1 mm ~ 10 mm の範囲であることを特徴とする請求項 1 から 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】

前記細胞または細胞部分が、緑藻類をアガロース中に包埋することによって平面層内に導入されることを特徴とする請求項 1 から 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

前記試験物質を、ピンツール、注射器システムまたは適当な圧力技術によってスポットの形で平面層、または平面層内に加えることを特徴とする請求項 1 から 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

前記発光が、蛍光および／または燐光の形態をとることを特徴とする請求項 1 から 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

前記励起光源が、白色光源、あるいは狭スペクトル分布（例えば発光ダイオード）の光源であり、連続励起および／またはパルス変調技術に使用されることを特徴とする請求項 1 から 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 10】

前記励起光源が昼光であることを特徴とする請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記検出器がまた、680 nm 超の波長範囲において感度がよく、イメージング特性を有することを特徴とする請求項 1 から 10 のいずれかに記載の方法。

【請求項 12】

使用する前記検出器が、例えば、ビジコンシステム、CCDカメラ、スキャナ、燐光イメージャまたは写真フィルムであることを特徴とする請求項 1 から 11 のいずれかに記載の方法。

【請求項 13】

時間分解光測定が、適切な場合、パルス励起ならびに励起と測定の相関付けと共に実施されることを特徴とする請求項 1 から 12 のいずれかに記載の方法。

【請求項 14】

励起照明とは独立に、光合成活性を制御するために補助照明または暗期を用いることを特

10

20

30

40

50

徴とする請求項 1 から 13 のいずれかに記載の方法。

【請求項 15】

無傷の光化学系を有する細胞または細胞部分を提供するステップと、
物質ゾーンをその上に被着させた、薄層クロマトグラフィープレートまたは電気泳動層または別の支持体を提供するステップと、
平面層に細胞または細胞部分を導入するステップと、
細胞または細胞部分を伴う平面層を、用意した薄層クロマトグラフィープレートまたは電気泳動層またはその他の支持体に付着させるステップと、
励起光源によって平面層内の細胞または細胞部分の発光を励起させるステップと、
検出器を用いて平面層内の細胞または細胞部分の発光を測定するステップと、
検出器信号を光合成阻害の程度と関連付けるステップと
を含む、物質の光合成阻害活性の検出方法。

10

【請求項 16】

物質ゾーンが、クロマトグラフ分離または電気泳動分離によって生成されたことを特徴とする請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

無傷光化学系を有する細胞または細胞部分を含む平面層と、
試験物質を平面層に、または平面層内に加える手段と、
平面層内の細胞または細胞部分の発光を励起させる励起光源と、
平面層内の細胞または細胞部分の発光を測定する検出器と、
検出器信号を光合成阻害の程度と関連付ける評価手段と
を含む、物質の光合成阻害活性を検出するシステム。

20

【請求項 18】

試験物質を平面層に、または平面層内に、または平面層の支持体に加える手段が、注射器システム、ピンツールまたは適当な圧力スタンプあるいは噴射システムであってよいことを特徴とする請求項 17 に記載のシステム。

【請求項 19】

使用する前記検出器が、例えば、ビジコンシステム、CCDカメラ、スキャナ、燐光イメージャまたは写真フィルムであることを特徴とする請求項 17 または 18 に記載のシステム。

30

【請求項 20】

前記評価が、イメージングによってまたは視覚的に実施されることを特徴とする請求項 17 から 19 のいずれかに記載のシステム。

【請求項 21】

平面層の前記支持体が、物質ゾーンをその上に被着させた薄層クロマトグラフィープレートまたは電気泳動層であることを特徴とする請求項 17 から 20 のいずれかに記載のシステム。

【請求項 22】

試験物質をテストストリップまたはセンサーチップに加えた後、またそれに続いて励起光源によって平面層内の細胞または細胞部分の発光を励起させた後、また検出器を用いて平面層内の細胞または細胞部分の発光を測定した後、検出器信号に基づいて試験物質の光合成阻害の程度を決定することができる、無傷光化学系の細胞または細胞部分を伴う平面層を含む、物質の光合成阻害活性を検出するためのテストストリップまたはセンサーチップ。

40

【請求項 23】

前記テストストリップまたはセンサーチップの平面層が、アガロースまたはアクリル酸ゲルまたは他のゲル基質または粘性溶液中における緑藻類からなることを特徴とする請求項 22 に記載のテストストリップまたはセンサーチップ。

【請求項 24】

前記細胞が、光合成系 I I が無傷のままの元気な細胞であることを特徴とする請求項 22

50

または23に記載のテストストリップまたはセンサーチップ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、従来技術と比べて、小型化および著しく高い試料スループットを可能にする、光合成阻害物質を検出する装置および方法に関する。

【背景技術】

【0002】

除草活性物質によって植物の光合成を阻害することは、物質の生態毒性評価にとって、また作物保護研究における除草活性物質の調査にとっても重要なパラメータである。したがって、光合成阻害活性を迅速に測定する強力な技法は、物質の生態毒性評価において、また新規な作物保護剤を探すスクリーニング法として非常に重要である。 10

【0003】

高等植物と微細藻類の両方に対する様々な試験が、光合成阻害活性の検定法として知られている。知られている測定原理は、特に、クロロフィル蛍光または光合成酸素発生の測定に基づいている (B. Hock, C. Fedtke, R. R. Schmidt, Herbicides [Herbizide], Georg Thieme Verlag, 1995, 54および112~114; D. Merz, M. Geyer, D. A. Moss, H. -J. Ache, Fresenius J. Anal. Chem., 1996, 354: 299~305)。従来技術を表すこれらすべての方法には、高スループット測定が可能でないという制限がある。というのは、これらの方法は、活性成分のスクリーニング、小型化、例えば高度の並列化を行うときに、または物質混合物の活性を検出する分析分離技術と直接組み合わせて実施するからである。 20

【0004】

クロロフィル蛍光の測定は、光合成プロセスを研究するための確立された標準法である。それに使用される方法では、それらの方法論がプローブまたはキュベットを用いた測定に基づいているため、逐次測定のみを可能とする蛍光光度計を利用し、したがって高スループット用途には適していない。さらに、このような方法はまた、小型化するのが非常に難しい。この技法のための一般的な測定器は、特に、以下に記載したメーカーから入手可能である: ADC Bioscientific Ltd., Hansatech Instruments, Heinz Walz GmbH, Qubit Systems Inc.。 30

【0005】

DF藻類試験 [DF-Algentest] では、水の試料を緑藻類で処理し、続いて測光測定する (Methods of Biological Water Analytics [Methoden der biologischen Wasseruntersuchung]、第2巻: Biologische Gewässeruntersuchung, G. Fischer Verlag, 1999, 386~388頁)。この試験では、第1のステップは、光合成色素錯体の遅延発光に関する非活性化速度を決定することである。対応する未処理の標準試料の非活性化速度と比べることによって、光合成阻害物質の有無に関する結論が引き出される。この方法は、連続して試料を処理することだけが可能であり、したがって、高スループット測定に適していない。 40

【0006】

さらなる制限は、装置の寸法により、DF藻類試験の試料量がミリリットル程度であることに関する。この方法では小型化が可能にならない。さらに、実際の試料に特徴的な物質混合物は、この方法によりその全体しか評価することができない。試料成分間の相互作用の可能性があるため、偽陽性のリスクがある。

【0007】

高等植物に関する試験も知られている (例えば、W. Bilger, U. Schreiber, M. Bock, Oecologia 102, 1995, 425~432頁を参照 50

のこと)。これらの試験では、蛍光を測定する方法によって光合成阻害に関する結果が得られる。この場合も、試験装置の形状により、高度の並列化および小型化が妨げられる。この場合も、物質混合物を全体としてしか評価することができない。

【0008】

欧州特許第588 139 A1では、物質混合物の試験が記載されている。物質混合物中の諸物質の生物学的作用は、クロマトグラフゾーンで試験すべき物質への物質混合物のクロマトグラフィーによる分離と、それに続く分離された個々の画分の生物検定（毒性）の組合せによって試験される。生物検定では、個々の画分を発光微生物と接触させ、それらの生物発光が個々の画分で局所的に変化することでこの画分の生物学的作用が示される。

10

【0009】

活性検定の並列化および小型化の可能性は、欧州特許第1 043 582 A2に記載されている。欧州特許第1 043 582 A2に開示されている方法によれば、活性センサーをその中に懸濁させた拡散律速基質からなるセンサー層が使用されている。試験物質の生物活性は、このセンサー層が試料と接触したときの光学信号によって示される。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明の目的は、従来技術と比べて、小型化および著しく高い試料スループットを可能にする、光合成阻害物質を検出する装置および方法を提供することにある。

20

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明の目的は、以下のステップを含む、物質の光合成阻害活性の検出方法によって達成される。

- ー 無傷の光化学系を有する細胞または細胞部分を提供するステップ
- ー 平面層内に細胞または細胞部分を導入するステップ
- ー 試験物質を平面層に、または平面層内に加えるステップ
- ー 励起光源によって平面層内の細胞または細胞部分の発光を励起させるステップ
- ー 検出器を用いて平面層内の細胞または細胞部分の発光を測定するステップ、および
- ー 検出器信号を光合成阻害の程度と関連付けるステップ。

30

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

細胞は、藻類、微細藻類、光合成系を有する細菌、特にシアノバクテリア、植物細胞培養物または植物ホモジネートに由来するものであってよい。この方法はまた、無傷の光学系II (PSII) が存在する限り、生命力が損なわれている細胞でも動作する。

【0013】

この細胞はまた、選択した変異体または遺伝的に改変した生物に由来するものであってもよい。

【0014】

平面層はゲル層であることが好ましい。この平面層の厚さは、0.1 mm～10 mmの範囲であることが好ましい。細胞または細胞部分は、例えば緑藻類をアガロースまたはアクリル酸ゲルまたは他のゲル化剤または粘性培地中に包埋することによって、平面層内に導入することができる。

40

【0015】

平面層、または平面層内への試験物質の添加は、例えば注射器技術またはピンツールまたは適当な圧力技術（噴射システムなど）によって好ましくはスポットの形で行う。

【0016】

発光は、蛍光および／または燐光（遅延発光）である。燐光の測定は、励起と発光を区別する必要がないので、蛍光の測定に比べて有利である。一方、蛍光を用いた測定は、その感度がより高いために有利である。

50

【0017】

適当な励起光源には、白色光源、例えばハロゲン光または蛍光灯だけでなく、狭スペクトル域内で発光する光源、例えば発光ダイオードもある。昼光も、励起光源として作用することができる。励起は、連続でもパルスモード（パルス変調技術）でもよい。

【0018】

検出は、680nm超の波長範囲で放射された発光のイメージングが十分な感度で可能な測定器を用いて行う（例えばビジコンシステム、CCDカメラ、スキャナ、燐光イメージャ、写真フィルム）。

【0019】

時間分解光測定は、適切な場合、パルス励起ならびに励起と測定の相関付けと共に実施することもできる。

【0020】

励起露光に関係なく、光合成活性を制御するために、補助照明または暗期（dark phase）を用いることができる。

【0021】

平面層に、または平面層上加えた本発明による光合成阻害試験物質は、光合成色素錯体の発光挙動に影響を与える。平面層に加えたアトラジンなどの光合成阻害剤のスポットは簡単に検出でき、多数のスポットがある場合は、それらの活性によって、例えば遅延発光（燐光）をかなり減衰させることによって、ビデオイメージング法を用いて同時に検出することができる。別の方法として、光化学系ⅠⅠが阻害されたときの光色素の蛍光の増大を用いて、PSⅠⅠ-活性物質スポットをイメージングすることもできる。

【0022】

本発明はさらに、本発明による方法を用いて物質の光合成阻害活性を検出するシステムに関する。このシステムは、以下のものを含む。

- 無傷の光化学系を有する細胞または細胞部分を含む平面層
- 試験物質を平面層に、または平面層内に加える手段
- 平面層内の細胞または細胞部分の発光を励起させる励起光源
- 平面層内の細胞または細胞部分の発光を測定する検出器
- 検出器信号を光合成阻害の程度と関連付ける評価手段。

【0023】

試験物質を平面層に、または平面層内に加える手段は、例えば注射器システム、鉄鋼針（ピンツール）または適当な圧力スタンプ、また噴射システムであってもよい。

【0024】

この評価は、視覚的に、または適当なイメージング技術を用いて行うことができる。

【0025】

本発明はさらに、試験物質を平面層に、または平面層内に加えた後、またそれに続いて励起光源によって平面層内の細胞または細胞部分の発光を励起させた後、また検出器を用いて平面層内の細胞または細胞部分の発光を測定した後、検出器信号に基づいて光合成阻害の程度を決定することができる、本発明による方法を用いて物質の光合成阻害活性を検出するための、無傷の光化学系を有する細胞または細胞部分を含む平面層を含むテストストリップまたはセンサーチップに関する。

【0026】

テストストリップまたはセンサーチップの平面層は、アガロースまたはアクリル酸ゲル中における緑藻類からなることが好ましい。この方法の場合、長期間にわたって貯蔵したときでさえ光合成阻害活性の試験系としてのその機能が保持される、安定な検出層を調製することができる。

【0027】

本発明による方法の利点は、光合成阻害物質の検出方法の高度の小型化および並列化である。並列化により、試料の高スループットを達成することができる。小型化により、かなり少ない材料で間に合わせることができる。

10

20

30

40

50

【0028】

本発明による方法により、数千個の物質スポットを9cm×12cmの範囲に適用することが可能になり、したがって並列化だけでなく、試験容積500nl未満において試験物質10ng未満の小型化の程度を達成することが可能になる。

【0029】

空間分解分析では、まず物質混合物を、薄層クロマトグラフィープレートまたは電気泳動層上でクロマトグラフィー分離または電気泳動分離にかけ、続いて請求項15に記載の本発明による方法を用いて、その画分の光合成阻害活性を分析することによって、面倒なく薄層クロマトグラムまたは電気泳動図中の物質混合物の成分である光合成阻害物質の同定が可能になる。

10

【0030】

空間分解分析ではまた、支持体の異なる位置への光合成阻害物質の適用、および本発明による方法を用いたこれらのスポットの光合成阻害活性の分析が可能になる。

【0031】

本発明による方法は、光合成阻害剤を最適化するための活性成分調査に使用することができる。さらなる適用分野は、例えば、汚染物質に帰せられる可能性のある排水および環境試料中の除草活性の特殊測定である。

【実施例1】

【0032】

実施例1は、本発明による層システムで誘起蛍光を用いた、光合成阻害物質の本発明による方法を用いた具体的な検出を示す。

20

【0033】

緑藻類(イカダモ(*Scenedesmus subspicatus*))をその中に懸濁させたアガロース薄層(層厚さ約4mm)を使用して、光合成阻害作用を検出した。

【0034】

緑藻類を以下の通りに増殖させた。

イカダモ貯蔵物由来の藻類を使用して、無菌の100ml三角フラスコに増殖培地50mlを播種する。続いて、この溶液を23℃で7日間、蛍光灯を備えた制御された環境のキャビネット中で露光した状態で125rpmで培養する。

【0035】

30

増殖培地には、

炭酸ナトリウム 58mg/l

硝酸ナトリウム 496mg/l

リン酸水素カリウム 39mg/l

硫酸マグネシウム七水和物 75mg/l

塩化カルシウム二水和物 36mg/l

Titriplex III 10mg/l

クエン酸 3mg/l

が含まれ、1N HClおよび/または1N NaOHを用いてpH7.5±0.2にする。この培地を121℃で20分間加圧滅菌してから使用する。

40

【0036】

藻類層の調製:

藻類懸濁液(光学濃度約2mAU)25mlを1%強度アガロースMP溶液(Boehringer Mannheim GmbH Art. No. 1388983)15mlと、40℃以下の温度で均質になるまで混合する。この懸濁液を冷却する前に1穴プレート(Nalge Nunc、Omni Tray Single Well 86×128mm)の中に入れ、そこで冷却後に均一に懸濁した藻類を含むゲル層が形成される。この検出層を即座に、あるいは数週間貯蔵した後に使用して、光合成阻害作用を測定することができる。

【0037】

50

検出層への物質の転移およびインキュベート：

本発明による並列活性試験を実施するために、96本ピンツール（Nalge Nunc 96 Pin Replicator）を用いて、藻類層にマイクロタイタープレートからの試験物質を型押しする（stamp）。したがって、マイクロタイタープレート上の試料被着物（表1参照）も、当該の物質の位置を藻類層上に移す。試験物質は、マイクロタイタープレート中でDMSO溶液（1穴当たり100 μ l中物質100 μ mol）の形で存在した。ピンツールを用いて、それぞれの場合に、1ピン当たり試料溶液約0.5 μ lを検出層に移した。型押しした検出層を室温で15分インキュベートした後、蛍光測定を行った。

【0038】

【表1】

表1：藻類層を含む96穴マイクロタイタープレートの蛍光イメージング
による物質の活性の並列検出

位 置	物 質	活 性
A 1		
B 1	グリホサート	
C 1	チジアズロン	
D 1	ペンディメタリン	
E 1	フルアジホップ-P-ブチル	
F 1	チフェンスルフロン-メチル	
G 1	キンメラック (Quinmerac)	
H 1	アイオキシニル	
A 2	MCPA	
B 2	テブチウロン	X
C 2	ジウロン	X
D 2	メフェナセット	
E 2	シアナジン	X
F 2	オキサジアゾン	
G 2	テルブティラジン	X
H 2	ジフルフェニカン	
A 3	ジカンバ	
B 3	アシフルオルフェン	
C 3	アメトリン	X
D 3	プロメトン	X
E 3	プロメトリン	X
F 3	スルホメツロン-メチル (Sulfometuron-methyl)	
G 3	—	
H 3	メトリブジン	X
A 4	ピラゾレート	
B 4	ノルフルラゾン	

10

20

30

40

位 置	物 質	活 性
C 4	リニユロン	X
D 4	E P T C	
E 4	メタザクロル	
F 4	メタミトロン	X
G 4	ナプロアミド (Nap ro a m i d)	
H 4	ベンタゾン	
A 5	ピリデート	
B 5	—	
C 5	プレチラクロール	
D 5	セトキシジム	
E 5	イソプロツロン	X
F 5	ニコスルフロン	
G 5	ブロマシル	X
H 5	ハロキシホップーPーメチル	
A 6	フェンメジファム	X
B 6	アラクロール	
C 6	—	
D 6	チオベンカーブ	
E 6	ジフェンゾコート	
F 6	イマザピル	
G 6	メトスルフロンーメチル	
H 6	メトラクロール	
A 7	プロパニル	X
B 7	クロピラリド	
C 7	ベンスルフロンーメチル	
D 7	—	
E 7	アトラジン	X
F 7	シマジン	X
G 7	—	

10

20

30

位 置	物 質	活 性
H 7	プロピザミド	
A 8	キンクロラック	
B 8	ジクワット	
C 8	ビフェノックス	
D 8	グルホシネート	
E 8	ブチレート	
F 8	エタルフルラリン	
G 8	スルコトリオン (Sulcotrione)	
H 8	トラルコキシジム	
A 9	アミトロール	
B 9	—	
C 9	ブタクロル	
D 9	ヘキサジノン	X
E 9	アロキシジム	
P 9	クロリムロン-エチル	
G 9	—	
H 9	メコプロップ	
A 10	フルオメツロン	X
B 10	フェノキサプロップ-P-エチル	
C 10	デスメディファム	X
D 10	プリミスルフロンメチル	
E 10	ジアレート	
F 10	アスラム	
G 10	—	
H 10	エトフメセート	
F 12	メタミトロン 50 ng	PS II 阻害の 対照物質
G 12	メタミトロン 125 ng	PS II 阻害の 対照物質
H 12	メタミトロン 250 ng	PS II 阻害の 対照物質

【0039】

蛍光イメージングによる活性の並列検出：

ビデオイメージングシステム (PerkinElmer Life Sciences 社製 Molecular Light Imager NightOWL) を使用して、蛍光イメージを記録した。測定を実施するために、1穴プレートライトテーブル上に置いた。この白色光源は、フィルター (Omega 475 RDF 40) によって波長を 475 nm 未満に制限した。蛍光を選択的に検出するために、カメラのレンズに 680 nm 超の光を通過させるフィルター (Andover P/N: 680FS10-50) を装備した。蛍光励起およびカメラによる記録を、1秒間にわたって同時に行った。ビデオイメージングシステムのスクリーン上で、蛍光イメージを視覚的に評価した。文書化するために、TIFF ファイルを適当なグラフィックプログラムでフォーマットし、ラベル表

10

20

30

40

50

示した (Adobe Photoshop 5.0、MS Powerpoint 97)。

【0040】

結果：

蛍光イメージから、22個の光点 (light spot) が現れた (図1参照)。これらのスポットに被着した物質は、光化学系と相互作用するので蛍光を増大させる。知られている光合成阻害剤であるメタミトロンを、対照物質としてF12、G12およびH12の位置に50ng、125ngおよび250ngの量で加えた。この並列検定で示したすべての物質および表1中でX印を付けた物質は、知られている光化学系II阻害剤である。

10

【実施例2】

【0041】

実施例2は、本発明による層システムで燐光を用いた、光合成阻害物質の本発明による方法を用いた具体的な検出を示す。

【0042】

藻類層を実施例1と同様にして調製した。

【0043】

実施例と同様の試験物質を藻類層の同一の位置に加えた。インキュベーションも同様に15分間行った。

【0044】

燐光イメージングによる活性の並列検出：

ビデオイメージングシステム (PerkinElmer Life Sciences社製Molecular Light Imager NightOWL) を使用して、燐光メーを記録した。測定のために、NUNCプレートを、白色光源を備えたライトテーブル上に置いた。燐光を記録するために、カメラレンズの前にフィルターを挿入しなかった。藻類層を90秒間露光して、燐光を励起させた。15秒後に、このイメージをカメラで露光時間30秒で撮影した。ビデオイメージングシステムのスクリーン上で、燐光イメージを視覚的に評価した。文書化するために、TIFFファイルを適当なグラフィックプログラムでフォーマットし、ラベル表示した (Adobe Photoshop 5.0、MS Powerpoint 97)。

20

30

【0045】

結果：

燐光イメージから、22個の灰色点 (dark spot) が現れた (図2参照)。これらのスポットに被着した物質は、光化学系と相互作用するので燐光をより急速に不活性化させる。知られている光合成阻害剤であるメタミトロンを、対照物質としてF12、G12およびH12の位置に50ng、125ngおよび250ngの量で加えた。この結果は、蛍光イメージングの結果とよく一致している (実施例1も参照のこと)。この並列検定で示したすべての物質は、知られている光化学系II阻害剤である。

【図面の簡単な説明】

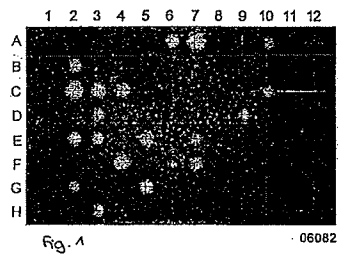
【0046】

【図1】 蛍光イメージから、22個の光点 (light spot) が現れた。

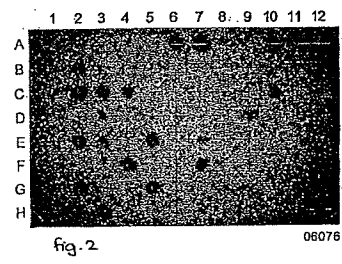
【図2】 燐光イメージから、22個の灰色点 (dark spot) が現れた。

40

【図 1】



【図 2】



【国際公開パンフレット】

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
23. Januar 2003 (23.01.2003)

PCT

WO 03/006684 A2

(51) Internationale Patentklassifikation: C12Q 1/02,
C12M 1/34

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/JP02/07057

(22) Internationales Anmeldedatum:
26. Juni 2002 (26.06.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
101 33 273.4 9. Juli 2001 (09.07.2001) DE(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): BAYER CROPSCIENCE AG (DE/775); Alfred-Nobel-
Strasse 50, 40789 Mönchengladbach (DE).(72) Erfinder: und
(73) Erfinder/Anmelder (nur für US): KREISS, Wolfgang
[DU/DH]; Lortzingstr. 18, 51467 Bergisch Gladbach (DE).
DREWES, Mark, Wilhelm [DE/DE]; Goethestr. 38,
40764 Langenfeld (DE). EBERZ, Günther [DE/DE];
Heidenhof 15, 51519 Odenbach-Idol (DE). CASPERS,
Norbert [DU/DH]; St. Maternus-Str. 14a, 51515
Klotten-Möchen (DE).(74) Gemeinsamer Vertreter: BAYER CROPSCIENCE
AG; Legal and Patents, Patents and Licensing, 51368
Leverkusen (DE).KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PL, PT, RO, RU,
SD, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
arabisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NI, SN, TD, TG).Erklärung gemäß Regel 4.17:
— hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu
beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer II) für die
folgenden Bestimmungsstaaten AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, GR, GU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA,
ZM, ZW, ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD,
SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), arabisches Patent (AM, AZ, BY,
KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE,
CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL,
PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).Veröffentlicht:
ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des BerichtsZur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: DEVICE AND METHOD FOR DETECTING PHOTOSYNTHESIS INHIBITION

(54) Bezeichnung: VORRICHTUNG UND VERFAHREN ZUM NACHWEIS DER PHOTOSYNTHESE-Hemmung

(57) Abstract: A method, system and test strip for detecting photosynthesis inhibition in substances by providing cells or parts of
cells with an intact photosystem, inserting said cells or cell parts into a planar layer, placing the test substance on the planar layer or
inside the planar layer, exciting the luminescence of the cells or cell parts in the planar layer by an exciting light source, measuring
the luminescence of the cells or cell parts in the planar layer by means of a detector and associating the detector signal with the
degree of photosynthesis inhibition.(57) Zusammenfassung: Verfahren, System und Teststreifen zum Nachweis der Photosynthese-hemmenden Wirkung von Substan-
zen durch Herstellung von Zellen oder Zellteilen mit einem intakten Photosystem, Einbringen der Zellen oder der Zellteile in eine
planare Schicht, Aufbringen der Prüfschicht auf die planare Schicht oder in die planare Schicht, Anregung der Lumineszenz der
Zellen oder der Zellteile in der planaren Schicht durch eine Anregungslichtquelle, Messung der Lumineszenz der Zellen oder der
Zellteile in der planaren Schicht mit einem Detektor und Zuordnung des Detektorsignals zum Grad der Photosynthese-Hemmung.

WO 03/006684 A2

Vorrichtung und Verfahren zum Nachweis der Photosynthese-Hemmung

Die Inhibierung der Photosynthese von Pflanzen durch herbizid wirksame Substanzen ist ein wichtiger Parameter für die ökotoxikologische Bewertung von Substanzen einerseits und für die Suche nach herbizid wirksamen Substanzen in der Pflanzenschutzforschung andererseits. Leistungsfähige Messtechniken für die rasche Erfassung der Photosynthese-hemmenden Wirkung besitzen daher bei der ökotoxikologischen Bewertung von Substanzen und als Screeningverfahren für die Suche nach neuen Pflanzenschutzwirkstoffen eine große Bedeutung.

Zur Prüfung auf Photosynthese-hemmende Wirkung sind verschiedene Tests sowohl an höheren Pflanzen wie auch an Mikroalgen bekannt. Die bekannten Messprinzipien beruhen dabei u. a. auf der Chlorophyll-Fluoreszenz oder auf der Messung der photosynthetischen Sauerstoffproduktion (B. Hock, C. Fedtke, R. R. Schmidt, Herbizide, Georg Thieme Verlag, 1995, 54 u. 112-114; D. Merz, M. Geyer, D. A. Moss, H.-J. Ache, Fresenius J. Anal. Chem, 1996, 354: 299-305). Diese den Stand der Technik repräsentierenden Verfahren weisen durchweg Begrenzungen auf, die Hochdurchsatzmessungen, wie sie beim Wirkstoffscreening durchgeführt werden, Miniaturisierungen z.B. Hochparallelisierung oder eine direkte Kopplungen mit analytischen Separationstechniken zur Wirkungsdetektion in Stoffgemischen nicht zulassen.

Die Messung der Chlorophyll-Fluoreszenz ist als Standard-Verfahren zur Untersuchung des Photosynthese-Prozesses etabliert. Die hier angewendeten Verfahren arbeiten mit Fluorimetern, die wegen ihrer auf Sonden- oder Klüvetten-Messungen beruhenden Methodik lediglich serielle Messungen zulassen und damit für Hochdurchsatz-Anwendungen nicht geeignet sind. Darüber hinaus lassen sich solche Verfahren auch nur schwer miniaturisieren. Typische Instrumente für diese Technik werden u. a. von den nachfolgend genannten Herstellern angeboten: ADC BioScientific Ltd., Hansatech Instruments, Heinz Walz GmbH, Qubit Systems Inc.

- Beim *DF-Algentest* werden Wasserproben mit Grünalgen versetzt und anschließend luminometrisch vermessen (Methoden der biologischen Wasseruntersuchung, Band 2: Biologische Gewässeruntersuchung, G. Fischer Verlag, 1999, Seite 386-388). Dabei wird zunächst die Abklingkinetik für die zeitverzögerte Lumineszenz des Photosynthese-Pigmentkomplexes ermittelt. Durch Vergleich mit der entsprechenden Abklingkinetik für eine unbelastete Referenzprobe wird auf die Gegenwart von Photosynthese-hemmenden Substanzen geschlossen. Dieses Verfahren kann Proben lediglich seriell bearbeiten und ist daher für Hochdurchsatzmessungen nicht geeignet.
- 5
- 10 Eine weitere Einschränkung betrifft das für den *DF-Algentest* notwendige Proben-
volumen, das bedingt durch die Dimensionierung der Messapparatur in der
Größenordnung von Millilitern liegt. Eine Miniaturisierung ist mit diesem Verfahren
nicht möglich. Weiterhin werden Stoffgemische, wie sie für reale Proben typisch
sind, von diesem Verfahren lediglich summarisch erfasst. Auf Grund möglicher
15 Interaktionen zwischen den Probeninhaltsstoffen besteht das Risiko für falsch
positive Resultate.
- Bekannt sind auch Tests an höheren Pflanzen (siehe z.B. W. Bilger, U. Schreiber, M.
Bock, *Oecologia* 102, 1995, S. 425-432). Diese Tests machen eine Aussagen zur
20 Photosynthese-Hemmung über ein Fluoreszenz-Messverfahren. Auch hier stellt die
Geometrie der Testvorrichtung ein Hindernis für die massive Parallelisierung und die
Miniaturisierung dar. Stoffgemische können wieder nur summarisch beurteilt
werden.
- 25 In EP 588 139 A1 wird ein Test für Stoffgemische beschrieben. Die biologische
Wirkung der Substanzen in einem Stoffgemisch wird geprüft durch eine Kombina-
tion von chromatographischer Auftrennung des Stoffgemischs in die zu testenden
Substanzen in chromatographische Zonen und einem anschließenden Test der biolo-
gischen Wirkung (Toxizität) der einzelnen aufgetrennten Fraktionen. Bei dem Test
30 der biologischen Wirkung werden die einzelnen Fraktionen in Kontakt mit
Leuchtmikroorganismen gebracht, die durch eine lokale Änderung ihrer Bio-

WO 03/006684

PCT/EP02/07057

- 3 -

lumineszenz an den einzelnen Fraktionen die biologische Wirkung dieser Fraktion anzeigen.

5 Die Möglichkeit der Parallelisierung und Miniaturisierung von Wirkungstests wird in EP 1 043 582 A2 beschrieben. Nach dem in EP 1 043 582 A2 offenbarten Verfahren wird eine Sensorschicht eingesetzt, die aus einer diffusionskontrollierenden Matrix und darin suspendierten Wirkungssensoren besteht. Beim Kontakt dieser Sensorschicht mit Proben wird die biologische Aktivität der Prüfsubstanzen durch optische Signale angezeigt.

10 Die Aufgabe der Erfindung ist es, eine Vorrichtung und ein Verfahren zur Erfassung von Photosynthese-hemmenden Substanzen bereitzustellen, das einen gegenüber dem Stand der Technik deutlich höheren Probendurchsatz und eine Miniaturisierung ermöglicht.

15 Die Lösung der erfindungsgemäßen Aufgabe besteht in einem Verfahren zum Nachweis der Photosynthese-hemmenden Wirkung von Substanzen enthaltend die Schritte

- 20
- Bereitstellung von Zellen oder Zellteilen mit einem intakten Photosystem,
 - Einbringen der Zellen oder der Zellteile in eine planare Schicht,
 - Aufbringen der Prüfsubstanz auf die planare Schicht oder in die planare Schicht,
 - Anregung der Lumineszenz der Zellen oder der Zellteile in der planaren
- 25
- Schicht durch eine Anregungslichtquelle,
 - Messung der Lumineszenz der Zellen oder der Zellteile in der planaren Schicht mit einem Detektor
 - Zuordnung des Detektorsignals zum Grad der Photosynthese-Hemmung.

30 Die Zellen können aus Algen, Mikroalgen, Bakterien insbesondere Cyanobakterien mit einem Photosynthesystem, Pflanzenzellkulturen oder Pflanzenhomogenisat

WO 03/006684

PCT/EP02/07057

- 4 -

stammen. Das Verfahren arbeitet auch mit Zellen, die in ihrer Vitalität geschädigt sind, solange ein intaktes Photosystem II (PS II) vorliegt.

Die Zellen können auch aus selektionierten Mutanten oder aus gentechnisch veränderten Organismen stammen.

Die planare Schicht ist vorzugsweise eine Gelschicht. Die planare Schicht hat vorzugsweise eine Dicke im Bereich von 0,1 mm bis 10 mm. Das Einbringen der Zellen oder der Zellteile in eine planare Schicht kann durch Einbettung z.B. von Grünalgen in Agarose- oder Acrylatgele oder andere Gelbildner oder viskose Medien erfolgen.

Das Aufbringen der Prüfsubstanz auf die planare Schicht oder in die planare Schicht erfolgt zum Beispiel mittels Spritzentechniken oder durch Pin-Tools oder geeignete Drucktechniken (Jetsysteme etc.), bevorzugt in Form von Spots.

Bei der Lumineszenz handelt es sich um Fluoreszenz und/oder Phosphoreszenz (zeitverzögerte Lumineszenz). Die Messung der Phosphoreszenz bietet im Vergleich zur Fluoreszenzmessung Vorteile, da kein Aufwand für die Diskriminierung von Anregung und Emission entsteht. Andererseits besitzt die Fluoreszenzmessung den Vorteil größerer Nachweisempfindlichkeit.

Als Anregungslichtquelle eignen sich sowohl Weißlichtquellen, z.B. Halogenlicht oder Leuchtstoffröhren wie auch Lichtquellen, die in einem schmalen Spektralbereich emittieren, z.B. Leuchtdioden. Als Anregungslichtquelle kann auch Tageslicht dienen. Die Anregung kann kontinuierlich oder in einem gepulsten Modus (Pulsmodulationstechnik) erfolgen.

Die Detektion erfolgt mit Instrumenten, die zu einer Abbildung der emittierten Lumineszenz im Wellenlängenbereich von > 680 nm mit hinreichender Empfindlichkeit in der Lage sind (z.B. Vidicon-System, CCD-Kamera, Scanner, Phosphorimager, photographischer Film).

WO 03/006684

PCT/EP02/07057

- 5 -

Es können auch zeitaufgelöste Lichtmessungen gegebenenfalls zusammen mit gepulster Anregung und Korrelation von Anregung und Messung durchgeführt werden.

- 5 Unabhängig von der Anregungsbelichtung kann eine zusätzliche Belichtung oder eine Dunkelphase zur Steuerung der Photosyntheseaktivität eingesetzt wird.

- Photosynthese-hemmende Prüfsubstanzen, die auf oder in die erfindungsgemäße planare Schicht aufgebracht werden, beeinflussen das Lumineszenzverhalten des
 10 Photosynthese-Pigment-Komplexes. Auf die planare Schicht aufgegebene Spots von Photosynthese-Hemmern wie Atrazin lassen sich z.B. durch signifikante Schwächung der zeitverzögerten Lumineszenz (Phosphoreszenz) mit Video-Imaging-Verfahren einfach und für eine große Zahl von Spots gleichzeitig über ihre Wirkung nachweisen. Alternativ hierzu kann auch die verstärkte Fluoreszenz der Photo-
 15 pigmente bei Inhibierung des Photosynthesesystems II zur Abbildung der PS II-aktiven Substanzspots dienen.

- Gegenstand der Erfindung ist weiterhin ein System zum Nachweis der Photosynthese-hemmenden Wirkung von Substanzen nach dem erfindungsgemäßen Ver-
 20 fahren, enthaltend

- eine planare Schicht mit Zellen oder Zellteilen mit einem intakten Photosystem,
- Mittel zum Aufbringen der Prüfsubstanz auf die planare Schicht oder in die
 25 planare Schicht,
- Anregungslichtquelle zur Anregung der Lumineszenz der Zellen oder der Zellteile in der planaren Schicht,
- Detektor zur Messung der Lumineszenz der Zellen oder der Zellteile in der planaren Schicht,
- 30 - Auswertemittel zur Zuordnung des Detektorsignals zum Grad der Photosynthese-Hemmung.

WO 03/006684

PCT/EP02/07057

- 6 -

Die Mittel zum Aufbringen der Prüfsubstanz auf die planare Schicht oder in die planare Schicht können z.B. Spritzensysteme, Stahlnadeln (Pin-Tools) oder geeignete Druckstempel sowie Jet-Systeme sein.

5 Die Auswertung kann visuell oder mittels geeigneter Bildverarbeitungstechniken erfolgen.

10 Gegenstand der Erfindung ist weiterhin ein Teststreifen oder Sensor-Chip zum Nachweis der Photosynthese-hemmenden Wirkung von Substanzen nach dem erfindungsgemäßen Verfahren enthaltend eine planare Schicht mit Zellen oder Zellteilen mit einem intakten Photosystem, wobei nach dem Aufbringen der Prüfsubstanz auf die planare Schicht oder in die planare Schicht, und nachfolgender Anregung der Lumineszenz der Zellen oder der Zellteile in der planaren Schicht durch eine
15 Anregungslichtquelle, und Messung der Lumineszenz der Zellen oder der Zellteile in der planaren Schicht mit einem Detektor, aus dem Detektorsignal der Grad der Photosynthese-Hemmung bestimmbar ist.

20 Die planare Schicht des Teststreifens oder Sensor-Chips besteht bevorzugt aus Grünalgen in Agarose- oder Acrylatgelen. Auf diese Weise lassen sich stabile Detektionsschichten herstellen, die ihre Funktion als Testsystem für die Photosynthese-Hemmwirkung auch bei Lagerung über längere Zeiträume beibehalten.

25 Ein Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens ist eine hohe Miniaturisierung und Parallelisierung des Nachweisverfahrens für Photosynthese-hemmende Substanzen. Durch die Parallelisierung kann ein hoher Probendurchsatz erzielt werden. Durch die Miniaturisierung kann ein erheblich geringerer Verbrauch an Materialien erreicht werden.

30 Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist es möglich, mehrere tausend Substanz-spots auf einer Fläche von 9 cm * 12 cm aufzubringen und damit neben der Paralleli-

WO 03/006684

PCT/EP02/07057

- 7 -

sierung einen Miniaturisierungsgrad von < 10 ng Prüfsubstanz in weniger als 500 nl Testvolumen zu erreichen.

Die ortsauflösende Wirkungserfassung erlaubt es, Photosynthese-hemmende Substanzen als Komponenten von Stoffgemischen störungsfrei in Dünnschichtchromatogrammen oder Elektropherogrammen zu identifizieren, indem zunächst das Stoffgemisch einer chromatographischen oder elektrophoretischen Trennung auf einer Dünnschichtchromatographieplatte oder einer Elektrophoreseschicht unterworfen wird und anschließend nach dem erfindungsgemäßen Verfahren gemäß Anspruch 15 die Photosynthese-hemmende Wirkung der Fraktionen untersucht wird.

Die ortsauflösende Wirkungserfassung erlaubt es auch, Photosynthese-hemmende Substanzen auf verschiedene Orte eines Trägers aufzugeben und Photosynthese-hemmende Wirkung dieser Spots mit dem erfindungsgemäßen Verfahren zu untersuchen.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann in der Wirkstoffforschung zur Optimierung von Photosynthese-Hemmern eingesetzt werden. Ein weiteres Einsatzfeld bildet zum Beispiel die spezifische Messung der auf Schadstoffe zurückzuführenden herbiziden Aktivität in Abwässern und Umweltproben.

WO 03/006684

PCT/EP02/07057

- 8 -

Figuren und Beispiele

Beispiel 1

- 5 In Beispiel 1 wird nach dem erfindungsgemäßen Verfahren der spezifische Nachweis photosynthesemmender Substanzen mittels induzierter Fluoreszenz in dem erfindungsgemäßen Schichtsystem gezeigt.

- 10 Zur Detektion der Photosynthese-Hemmwirkung wurde eine dünne Agaroseschicht (ca. 4 mm Schichthöhe), in die Grünalgen (*Scenedesmus subspicatus*) suspendiert worden waren, eingesetzt.

Die Grünalgen wurden folgendermaßen angezüchtet:

- 15 Aus einer Stammkonserve *Scenedesmus subspicatus* werden die Algen in einen sterilen 100 ml Erlenmeyerkolben, der 50 ml Anzucht-Medium enthält überimpft. Anschließend wird die Lösung bei 23°C und bei 125 rpm in einem mit Leuchtstoffröhren ausgerüsteten Klimaschrank unter Lichteinwirkung für 7 Tage inkubiert.

Das Anzucht-Medium enthält:

- 20 58 mg/l Natriumcarbonat
496 mg/l Natriumnitrat
39 mg/l Kaliumhydrogenphosphat
75 mg/l Magnesiumsulfatheptahydrat
36 mg/l Calciumchloriddihydrat
25 10 mg/l Titriplex III
3 mg/l Zitronensäure
und wird mit Hilfe von 1 N HCl bzw. 1 N NaOH auf pH 7,5 ± 0,2 eingestellt. Das Medium wird vor Gebrauch bei 121°C für 20 min autoklaviert.

WO 03/006684

PCT/EP02/07057

- 9 -

Herstellung der Algenschicht:

25 ml der Algensuspension (optische Dichte ca. 2 mAU) werden bei Temperaturen unter 40°C mit 15 ml 1 % Agarose MP-Lösung (Boehringer Mannheim GmbH Art. Nr. 1388983) homogen gemischt. Diese Suspension wird vor dem Erkalten in eine Single Well-Platte (Nalge Nunc, Omni Tray Single Well 86 x 128 mm) gegeben. Dort bildet sich beim Abkühlen eine Gelschicht mit gleichförmig suspendierten Algen aus. Diese Detektionsschicht kann sofort oder auch nach mehreren Wochen Lagerung zur Messung der Photosynthese-Hemmwirkung eingesetzt werden.

10 Substanztransfer auf Detektionsschicht und Inkubation:

Für den erfindungsgemäßen parallelen Wirkungstest wurden Testsubstanzen aus einer Mikrotiterplatte mit einem 96-fach Pintool (Nalge Nunc 96 Pin Replicator) auf die Algenschicht gestempelt. Die Probenbelegung der Mikrotiterplatte (siehe Tabelle 1) legt damit auch die Position der jeweiligen Substanz auf der Algenschicht. Dabei lagen die Testsubstanzen in der Mikrotiterplatte als DMSO-Lösung (100 µMol Substanz in 100 µl je Well) vor. Mit dem Pin Tool wurden jeweils ca. 0,5 µl Probe-lösung je Pin auf die Detektionsschicht übertragen. Vor der Fluoreszenzmessung wurde die bestempelte Detektionsschicht bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert.

20

Tabelle 1: Parallele Detektion der Wirkung von Substanzen durch
Fluoreszenz Imaging auf 96er-Mikrotiterplatte mit Algenschicht

Position	Substanz	Wirkung
A1		
B1	Glyphosat	
C1	Thidiazuron	
D1	Pendimethalin	
E1	Fluazifop-P-butyl	
F1	Thifensulfuron-methyl	
G1	Quinmerac	
H1	Ioxynil	
A2	MCPA	
B2	Tebuthiuron	X
C2	Diuron	X
D2	Mefenacet	
E2	Cyanazin	X
F2	Oxadiazon	
G2	Terbuthylazin	X
H2	Diflufenican	
A3	Dicamba	
B3	Acifluorfen	
C3	Ametryn	X
D3	Prometon	X
E3	Prometryn	X
F3	Sulfometuron-methyl	
G3	-	
H3	Metribuzin	X
A4	Pyrazolat	
B4	Norflurazon	

WO 03/005684

PCT/EP02/07057

- 11 -

Position	Substanz	Wirkung
C4	Linuron	X
D4	EPTC	
E4	Metazachlor	
F4	Metamitron	X
G4	Naproamid	
H4	Bentazon	
A5	Pyridat	
B5	-	
C5	Pretilachlor	
D5	Sethoxydim	
E5	Isoproturon	X
F5	Nicosulfuron	
G5	Bromacil	X
H5	Haloxifop-P-methyl	
A6	Phenmedipham	X
B6	Alachlor	
C6	-	
D6	Thiobencarb	
E6	Difenzoquat	
F6	Imazapyr	
G6	Metsulfuron-methyl	
H6	Metolachlor	
A7	Propanil	X
B7	Clopyralid	
C7	Bensulfuron-methyl	
D7	-	
E7	Atrazin	X
F7	Simazin	X
G7	-	

WO 03/006684

PCT/EP02/07057

- 12 -

Position	Substanz	Wirkung
H7	Propyzamid	
A8	Quinchlorac	
B8	Diquat	
C8	Bifenox	
D8	Glufosinat	
E8	Butylat	
F8	Ethalfuralin	
G8	Sulcotrione	
H8	Tralkoxydim	
A9	Amitrol	
B9	-	
C9	Butachlor	
D9	Hexazinon	X
E9	Alloxydim	
F9	Chlorimuron-ethyl	
G9	-	
H9	Mecoprop	
A10	Fluometuron	X
B10	Fenoxaprop-P-ethyl	
C10	Desmedipham	X
D10	Primisulfuron	
E10	Diallat	
F10	Asulam	
G10	-	
H10	Ethofumesat	
F12	50 ng Metamitron	Referenz PSII-Hemmung
G12	125 ng Metamitron	Referenz PSII-Hemmung
H12	250 ng Metamitron	Referenz PSII-Hemmung

Parallele Detektion der Wirkung durch Fluoreszenz Imaging:

Zur Aufnahme des Fluoreszenz-Bildes wurde ein Videoimaging System (Molecular Light Imager NightOWL von PerkinElmer Life Sciences) eingesetzt. Für die Messung wurde die Single Well-Platte auf einen Leuchttisch platziert, dessen Weißlichtquelle mit einem Filter (Omega 475 RDP 40) auf Wellenlängen unterhalb von 475 nm begrenzt wurde. Zur selektiven Erfassung des Fluoreszenzlichts wurde das Kameraobjektiv mit einem Filter ausgerüstet, der Licht oberhalb 680 nm passieren lässt (Andover P/N: 680FS10-50). Die Fluoreszenzanregung und die Kameraaufnahme erfolgten simultan für einen Zeitraum von 1 Sekunde. Die Auswertung des Fluoreszenzbildes erfolgte visuell am Bildschirm des Videoimagingssystems. Zur Dokumentation wurden TIFF-Files mit geeigneten Grafikprogrammen formatiert und beschriftet (Adobe Photoshop 5.0, MS Powerpoint 97).

Ergebnisse:

Das Fluoreszenz-Image zeigt 22 helle Spots (siehe Figur 1). Die dort deponierten Substanzen bewirken auf Grund ihrer Wechselwirkung mit dem Photosystem eine Steigerung der Fluoreszenz. Auf den Positionen F12, G12, H12 war als Referenzsubstanz Metamitron, ein bekannter Photosynthesehemmer, mit den Mengen 50 ng, 125 ng und 250 ng aufgetragen worden. Alle in diesem Parallelassay aufgefallenen Substanzen und in Tabelle 1 mit X gekennzeichneten Substanzen sind als Hemnstoffe des Photosystems II bekannt.

Beispiel 2

In Beispiel 2 wird nach dem erfindungsgemäßen Verfahren der spezifische Nachweis photosynthesehemmender Substanzen mittels Phosphoreszenz in dem erfindungsgemäßen Schichtsystem gezeigt.

Die Algenschicht wurde analog Beispiel 1 hergestellt.

Es wurden die gleichen Testsubstanzen wie in Beispiel 1 und in identischer Positionierung auf die Algenschicht aufgebracht. Die Inkubation erfolgte ebenfalls für 15 Minuten.

- 5 Parallele Detektion der Wirkung durch Phosphoreszenzimagining:
Zur Aufnahme des Phosphoreszenz-Bildes wurde ein Videoimaging System (Molecular Light Imager NightOWL von PerkinElmer Life Sciences) eingesetzt. Für die Messung wurde die NUNC-Platte auf einen Leuchttisch platziert, der mit einer Weißlichtquelle ausgerüstet war. Zur Erfassung des Phosphoreszenzlichts wurden
10 keine Filter vor dem Kameraobjektiv eingesetzt. Zur Phosphoreszenzanregung wurde die Algenschicht für 90 Sekunden belichtet. Nach einer Wartezeit von 15 Sekunden erfolgte die Kameraaufnahme mit einer Aufnahmezeit von 30 Sekunden. Die Auswertung des Phosphoreszenzbildes erfolgte visuell am Bildschirm des Videoimagingssystems. Zur Dokumentation wurden TIRF-Files mit geeigneten
15 Grafikprogrammen formatiert und beschriftet (Adobe Photoshop 5.0, MS Powerpoint 97).

Ergebnisse:

- Das Phosphoreszenz-Image zeigt 22 dunkle Spots (siehe Figur 2). Die dort
20 deponierten Substanzen bewirken auf Grund ihrer Wechselwirkung mit dem Photosystem ein rascheres Abklingen der Phosphoreszenz. Auf den Positionen F12, G12, H12 war als Referenzsubstanz Metamitron, ein bekannter Photosyntheseshemmer, mit den Mengen 50 ng, 125 ng und 250 ng aufgetragen worden. Die Resultate stimmen gut mit den Ergebnissen des Fluoreszenzimagings überein (siehe auch Beispiel 1).
25 Alle in diesem Parallelassay aufgefallenen Substanzen sind als Hemmstoffe des Photosystems II bekannt.

WO 03/006684

PCT/EP02/07057

- 15 -

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis der Photosynthese-hemmenden Wirkung von Sub-
stanzen enthaltend die Schritte
5
 - Bereitstellung von Zellen oder Zellteilen mit einem intakten Photo-
system,
 - Einbringen der Zellen oder der Zellteile in eine planare Schicht,
 - Aufbringen der Prüfsubstanz auf die planare Schicht oder in die
10 planare Schicht,
 - Anregung der Lumineszenz der Zellen oder der Zellteile in der
planaren Schicht durch eine Anregungslichtquelle,
 - Messung der Lumineszenz der Zellen oder der Zellteile in der
planaren Schicht mit einem Detektor und
 - 15 - Zuordnung des Detektorsignals zum Grad der Photosynthese-
Hemmung.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen aus
Algen, Mikroalgen, Cyanobakterien, anderen Bakterien mit einem Photo-
synthesesystem, Pflanzenzellkulturen, Pflanzenhomogenisat, selektionierten
20 Mutanten oder aus gentechnisch veränderten Organismen stammen.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei
den Zellen um avitale Zellen handelt, bei denen das Photosynthese II-System
25 noch intakt ist.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass
die Matrix der planaren Schicht bevorzugt aus Agarose oder Acrylat, oder
anderen Gelbildnern oder anderen viskosen Medien besteht.
30

WO 03/066684

PCT/EP02/07057

- 16 -

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die planare Schicht eine Dicke im Bereich von 0,1 mm bis 10 mm hat.
- 5 6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Einbringen der Zellen oder der Zellteile in die planare Schicht durch Einbettung von Grünalgen in Agarose erfolgt.
- 10 7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass das Aufbringen der Prüfsubstanz auf die planare Schicht oder in die planare Schicht durch Pin-Tools, Spritzensysteme oder geeignete Drucktechniken in Form von Spots erfolgt.
- 15 8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Lumineszenz um Fluoreszenz und/oder Phosphoreszenz handelt.
- 20 9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Anregungslichtquelle eine Weißlichtquelle oder aber eine Lichtquelle mit enger spektraler Verteilung (z.B. Leuchtdioden) darstellt und für die kontinuierliche Anregung und/oder für Pulsmodulationstechniken eingesetzt wird.
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Anregungslichtquelle Tageslicht ist.
- 25 11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass der Detektor auch in einem Wellenlängenbereich von > 680 nm empfindlich ist und bildgebende Eigenschaften hat.
- 30 12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass als Detektor z.B. ein Vidicon-System, eine CCD-Kamera, ein Scanner, ein Phosphorimager oder ein photographischer Film eingesetzt wird.

WO 03/006684

PCT/EP02/07057

- 17 -

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass
zeitaufgelöste Lichtmessungen gegebenenfalls zusammen mit gepulster An-
regung und Korrelation von Anregung und Messung durchgeführt werden.
- 5 14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass
unabhängig von der Anregungsbelichtung eine zusätzliche Belichtung oder
eine Dunkelphase zur Steuerung der Photosyntheseaktivität eingesetzt wird.
- 10 15. Verfahren zum Nachweis der Photosynthese-hemmenden Wirkung von
Substanzen enthaltend die Schritte
- Bereitstellung von Zellen oder Zellteilen mit einem intakten Photosystem,
 - Bereitstellung einer Dünnschichtchromatographieplatte oder einer Elektro-
phoreseschicht oder eines anderen Trägers mit darauf deponierten
15 Substanzzonen,
 - Einbringen der Zellen oder der Zellteile in eine planare Schicht,
 - Aufbringen der planaren Schicht mit den Zellen oder Zellteilen auf die
bereitgestellte Dünnschichtchromatographieplatte oder Elektrophoreseschicht
20 oder den anderen Träger,
 - Anregung der Lumineszenz der Zellen oder der Zellteile in der planaren
Schicht durch eine Anregungslichtquelle,
 - Messung der Lumineszenz der Zellen oder der Zellteile in der planaren
Schicht mit einem Detektor und
 - 25 - Zuordnung des Detektorsignals zum Grad der Photosynthese-Hemmung.
16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass die
Substanzzonen durch chromatographische oder elektrophoretische Trennung
erzeugt worden sind.
- 30

WO 03/006684

PCT/EP02/07057

- 18 -

17. System zum Nachweis der Photosynthese-hemmenden Wirkung von Substanzen, enthaltend
- eine planare Schicht mit Zellen oder Zellteilen mit einem intakten Photosystem,
 - Mittel zum Aufbringen der Prüfsubstanz auf die planare Schicht oder in die planare Schicht oder auf einen Träger, der die planare Schicht trägt,
 - Anregungslichtquelle zur Anregung der Lumineszenz der Zellen oder der Zellteile in der planaren Schicht,
 - Detektor zur Messung der Lumineszenz der Zellen oder der Zellteile in der planaren Schicht,
 - Auswertemittel zur Zuordnung des Detektorsignals zum Grad der Photosynthese-Hemmung.
18. System nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass das Mittel zum Aufbringen der Prüfsubstanz auf die planare Schicht oder in die planare Schicht oder auf den Träger der planaren Schicht ein Spritzensystem, ein Pin-Tool oder ein geeigneter Druckstempel sowie ein Jet-System sein kann.
19. System nach Anspruch 17 oder 18, dadurch gekennzeichnet, dass als Detektor z.B. ein Vidicon-System, eine CCD-Kamera, ein Scanner, ein Phosphor-imager oder ein photographischer Film eingesetzt wird.
20. System nach einem der Ansprüche 17 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass die Auswertung mittels Bildverarbeitung oder visuell erfolgt.
21. System nach einem der Ansprüche 17 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass sich der Träger für die planare Schicht eine Dünnschichtchromatographieplatte oder einer Elektrophoreseschicht mit darauf deponierten Substanzonen ist.

WO 03/006684

PCT/EP02/07057

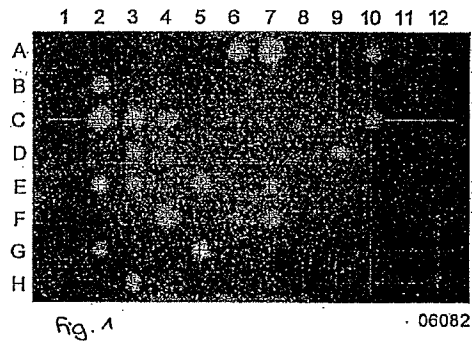
- 19 -

22. Teststreifen oder Sensor-Chip zum Nachweis der Photosynthese-hemmenden Wirkung von Substanzen enthaltend eine planare Schicht mit Zellen oder Zellteilen mit einem intakten Photosystem, wobei nach dem Aufbringen der Prüfsubstanz auf den Teststreifen oder Sensor-Chip, und nachfolgender
- 5 Anregung der Lumineszenz der Zellen oder der Zellteile in der planaren Schicht durch eine Anregungslichtquelle, und Messung der Lumineszenz der Zellen oder der Zellteile in der planaren Schicht mit einem Detektor, aus dem Detektorsignal der Grad der Photosynthese-Hemmung der Prüfsubstanz bestimmbar ist.
- 10 23. Teststreifen oder Sensor-Chips nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass die planare Schicht des Teststreifen oder Sensor-Chips aus Grünalgen in Agarose- oder Acrylatgelen oder anderen Gelmatrices oder viskosen Lösungen besteht.
- 15 24. Teststreifen oder Sensor-Chips nach Anspruch 22 oder 23, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Zellen um avitale Zellen handelt, bei denen das Photosynthese-II-System noch intakt ist.

WO 03/006684

PCT/EP02/07057

- 1/2 -



WO 03/006684

PCT/EP02/07057

-2/2-

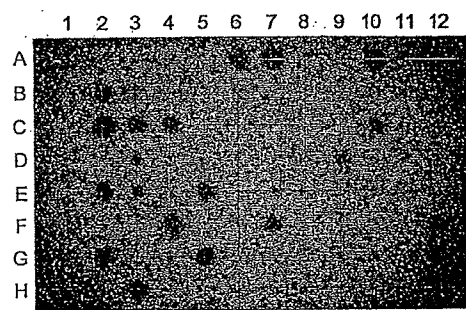


fig. 2

06076

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
23. Januar 2003 (23.01.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/006684 A3

(51) Internationale Patentklassifikation: C12Q 1/02,
C12M 1/34

MY, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,
SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/JP02/07057

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, NG, SN, TD, TG).

(23) Internationales Anmeldedatum:
26. Juni 2002 (26.06.2002)

(25) Erfindungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität: 9. Juli 2001 (09.07.2001) DE
101 33 273.4

Erklärung gemäß Regel 4.17:

— hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu
beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii) für die
folgenden Bestimmungsstaaten AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BK, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EG, ES, FI, FR, GB, GR, GM,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SE, SG, SI,
SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA,
ZM, ZW, ARIPO-Patente (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD,
SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY,
KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE,
CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL,
PT, SE, TR), OAPI-Patente (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, NG, SN, TD, TG).

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): BAYER CROSCIENCE AG (DE/DE); Alfred-No-
bel-Strasse 50, 40789 Monheim (DE).

(72) Erfinder; und
(73) Erfinder/A anmeldender (nur für US): KREISS, Wolfgang
(DE/DE); Lönzingstr. 18, 51467 Bergisch Gladbach (DE);
DREWES, Mark, Wilhelm (DE/DE); Goethestr. 38,
40764 Langenfeld (DU); EBERZ, Gbhaber (DU/DU);
Heiderhof 15, 51519 Odenthal-Holz (DU); CASPERS,
Norbert (DE/DE); St. Maternus-Park 14a, 51515
Kürten-Bechen (DE).

(74) Gemeldeter Vertreter: BAYER CROSCIENCE
AG; Legal and Patents, Patents and Licensing, 51368
Leverkusen (DE).

Veröffentlicht:
mit internationalem Recherchenbericht

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts: 1. Mai 2003

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EG, ES, FI, FR, GB, GR, GM,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: DEVICE AND METHOD FOR DETECTING PHOTOSYNTHESIS INHIBITION

(54) Bezeichnung: VORRICHTUNG UND VERFAHREN ZUM NACHWEIS DER PHOTOSYNTHESE-Hemmung

(57) Abstract: A method, system and test strip for detecting photosynthesis inhibition in substances by providing cells or parts of
cells with an intact photosystem, inserting said cells or cell parts into a planar layer, placing the test substance on the planar layer or
inside the planar layer, exciting the luminescence of the cells or cell parts in the planar layer by an exciting light source, measuring
the luminescence of the cells or cell parts in the planar layer by means of a detector and associating the detector signal with the
degree of photosynthesis inhibition.

(57) Zusammenfassung: Verfahren, System und Teststreifen zum Nachweis der Photosynthese-hemmenden Wirkung von Substan-
zen durch Herstellung von Zellen oder Zellteilen mit einem intakten Photosystem, Einbringen der Zellen oder der Zellteile in eine
planare Schicht, Aufbringen der Prüfsubstanz auf die planare Schicht oder in die planare Schicht, Anregung der Lumineszenz der
Zellen oder der Zellteile in der planaren Schicht durch eine Anregungslichtquelle, Messung der Lumineszenz der Zellen oder der
Zellteile in der planaren Schicht mit einem Detektor und Zuordnung des Detektorsignals zum Grad der Photosynthese-Hemmung.

WO 03/006684 A3

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 02/07057
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/02 C12M1/34		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12Q 601N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) BIOSIS, EPO-Internal, INSPEC, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Choice of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	EP 1 134 585 A (CONSIGLIO NAZIONALE RICERCA) 19 September 2001 (2001-09-19) Page 5, Paragraph 25 and 28; Claims 9 - 12*	1-12
P, X	KOBLIZEK MICHAL ET AL: "A biosensor for the detection of triazine and phenylurea herbicides designed using photosystem II coupled to a screen-printed electrode." BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, vol. 78, no. 1, 5 April 2002 (2002-04-05), pages 110-116, XP002219048 ISSN: 0006-3592 Abstract; Page 111, last and penultimate Line --/--	1-12
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is used to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 31 October 2002		Date of mailing of the international search report 17/01/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3010		Authorized officer Thiele, U

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 02/07057
C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 99 19900 A (PATTERNING TECHNOLOGIES LTD ;SPEAKMAN STUART (GB); THIN FILM TECHN) 22 April 1999 (1999-04-22) page 71-72	1-24
Y	BREWSTER JD ET AL.: "Storage and immobilization of Photosystem II reaction centers used in an assay for herbicides" ANAL CHEM, vol. 67, 1995, pages 1296-1299, XP002219049 *page 1296, l.h. col.; page 1297 "Immobilization"; Fig. 2*	1-24
Y	KAPUR R ET AL.: "Streamlining the drug discovery process by integrating miniaturization, high throughput screening, high content screening, and automation on the CellChip/sup TM/ system" BIOMEDICAL MICRODEVICES, 1999, KLUMER ACADEMIC PUBLISHERS, USA, vol. 2, no. 2, pages 99-109, XP002162337 ISSN: 1387-2176 abstract; figure 2	1-24
A	HIDEAKI MATSUOKA ET AL.: "CO2 STRESS SENSING USING A TOBACCO LEAF ON THE BASIS OF CHLOROPHYLLFLUORESCENCE ANALYSIS" SENSORS AND ACTUATORS B, ELSEVIER SEQUOIA S.A., LAUSANNE, CH, vol. B17, no. 2, 1994, pages 85-92, XP000428653 ISSN: 0925-4005 Page 86, Paragraph 2.4	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No.
PCT/EP 02/07057

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1134585	A	19-09-2001	IT RM20000112 A1 01-06-2000 DE 1134585 T1 21-02-2002 EP 1134585 A2 19-09-2001
WO 9919900	A	22-04-1999	GB 2330451 A 21-04-1999 GB 2330331 A 21-04-1999 AU 9451098 A 03-05-1999 CA 2306384 A1 22-04-1999 EP 1027723 A2 16-08-2000 WO 9919900 A2 22-04-1999 US 2002105080 A1 08-08-2002 GB 2369087 A , B 22-05-2002

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2002)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT		Internationales Abkürzungen PCT/EP 02/07057
A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 C12Q1/02 C12M1/34		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierte Mindestprüfart (Klassifikationsystem und Klassifikationsymbole) IPK 7 C12Q G01N		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfart gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) BIOSIS, EPO-Internal, INSPEC, WPI Data		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der ihr Betrachtkommenden Teile	Bez. Anspruchs Nr.
P,X	EP 1 134 585 A (CONSIGLIO NAZIONALE RICERCA) 19. September 2001 (2001-09-19) *Seite 5, Absätze 25 und 26; Ansprüche 9 - 12*	1-12
P,X	KOBLIZEK MICHAL ET AL: "A biosensor for the detection of triazine and phenylurea herbicides designed using photosystem II coupled to a screen-printed electrode," BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, Bd. 78, Nr. 1, 5. April 2002 (2002-04-05), Seiten 110-116, XP002219048 ISSN: 0006-3592 *Zusammenfassung; Seite 111, letzte und vorletzte Zeile*	1-12
<input checked="" type="checkbox"/> Welche Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" Stille Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht werden ist "L" Veröffentlichung, die gedruckt ist, einen Prioritätsanspruch zweifelsfrei einschließen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum oder anderen in Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie angegeben) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Demonstration, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist		
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann als ein Auszug dieser Veröffentlichung, wobei ein Teil oder auf erfindungsfähiger Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindungsfähiger Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Abschließendes Datum des internationalen Recherchenberichts	
31. Oktober 2002	17/01/2003	
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.O. Box 5018 Patentkanal 2 NL - 2200 RB Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2340, Tlx 31 651 epo nl Fax (+31-70) 340-3018	Bevollmächtigter Bodiensteller Thiele, U	

Formblatt PCT/ISA/210 (Rev. 03) (AA 1002)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

 Internationales Abkürzungen
 PCT/EP 02/07057

C4(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Seit. Anspruch Nr.
Y	WO 99 19900 A (PATTERNING TECHNOLOGIES LTD ;SPEAKMAN STUART (GB); THIN FILM TECHN) 22. April 1999 (1999-04-22) Seite 71-72	1-24
Y	BREWSTER JD ET AL.: "Storage and immobilization of Photosystem II reaction centers used in an assay for herbicides" ANAL CHEM. Bd. 67, 1995, Seiten 1296-1299, XP002219049 *page 1296, l.h. col.; page 1297 "Immobilization"; Fig. 2*	1-24
Y	KAPUR R ET AL.: "Streamlining the drug discovery process by integrating miniaturization, high throughput screening, high content screening, and automation on the CellChip/sup TM/ system" BIOMEDICAL MICRODEVICES, 1999, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, USA, Bd. 2, Nr. 2, Seiten 99-109, XP002162337 ISSN: 1387-2176 Zusammenfassung; Abbildung 2	1-24
A	HIDEAKI MATSUOKA ET AL.: "CO2 STRESS SENSING USING A TOBACCO LEAF ON THE BASIS OF CHLOROPHYLLFLUORESCENCE ANALYSIS" SENSORS AND ACTUATORS B, ELSEVIER SEQUOIA S.A., LAUSANNE, CH, Bd. B17, Nr. 2, 1994, Seiten 85-92, XP000428653 ISSN: 0925-4005 *Seite 86, Absatz 2.4*	

Formblatt PCT/AA/EP10 (Fortsetzung von Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT
 Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

 Internationaler Anmeldetag
PCT/EP 02/07057

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 1134585	A	19-09-2001	IT RM20000112 A1 01-06-2000
		DE 1134585 T1 21-02-2002	
		EP 1134585 A2 19-09-2001	
WO 9919900	A	22-04-1999	GB 2330451 A 21-04-1999
		GB 2330331 A 21-04-1999	
		AU 9451098 A 03-05-1999	
		CA 2306384 A1 22-04-1999	
		EP 1027723 A2 16-08-2000	
		WO 9919900 A2 22-04-1999	
		US 2002105080 A1 08-08-2002	
		GB 2369087 A , B 22-05-2002	

Formblatt: PCT/ISA/210 (Vorlage Patentfamilie) (Juli 1992)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

F I

テーマコード (参考)

G O 1 N 21/64 Z

G O 1 N 21/78 C

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN, TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE, GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,P L,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 クライス, ブオルフガング

ドイツ国、5 1 4 6 7・ベルギシュ・グラートバツハ、ロルツイングシユトラーセ・1 8

(72)発明者 ドレベス, マルク・ビルヘルム

ドイツ国、4 0 7 6 4・ランゲンフェルト、ゲーテシユトラーセ・3 8

(72)発明者 エーベルツ, ギユンター

ドイツ国、5 1 5 1 9・オーデンタールーホルツ、ハイデルホーフ・1 5

(72)発明者 カスペルス, ノルベルト

ドイツ国、5 1 5 1 5・キユルテンーベヘン、ザンクト・マテルヌスーエツク・1 4・アー

Fターム(参考) 2G043 AA03 BA16 BA17 DAO1 DAO6 DAO8 EA01 EA02 EA18 EA19

FA01 GA07 GA25 GB16 GB21 HA01 JA02 KA02 KA05 KA08

LA03 LA04

2G054 AA08 CA20 EA02 GA04 GA09

4B029 AA07 AA08 AA21 BB02 BB04 BB12 CC05 FA07 FA12

4B063 QA18 QQ06 QQ09 QQ61 QQ91 QR41 QR75 QR78 QR82 QS12

QS36 QS39 QX01